

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 9 月 12 日 (12.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/070714 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/53,
9/02, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 7/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/01928
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 1 日 (01.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-58698 2001 年 3 月 2 日 (02.03.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一ファインケミカル株式会社 (DAIICHI FINE CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒933-8511 富山県 高岡市 長慶寺 530 番地 Toyama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坂本 恵司
- (SAKAMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒933-8511 富山県 高岡市 長慶寺 530 番地 第一ファインケミカル株式会社内 Toyama (JP). 北 伸二 (KITA, Shinji) [JP/JP]; 〒933-8511 富山県 高岡市 長慶寺 530 番地 第一ファインケミカル株式会社内 Toyama (JP). 津崎 和也 (TSUZAKI, Kazuya) [JP/JP]; 〒933-8511 富山県 高岡市 長慶寺 530 番地 第一ファインケミカル株式会社内 Toyama (JP). 森川 忠則 (MORIKAWA, Tadanori) [JP/JP]; 〒933-8511 富山県 高岡市 長慶寺 530 番地 第一ファインケミカル株式会社内 Toyama (JP). 清水 昌 (SHIMIZU, Sakaya) [JP/JP]; 〒616-8212 京都府 京都市右京区 常盤山下町 6-9 Kyoto (JP). 片岡 道彦 (KATAOKA, Michihiko) [JP/JP]; 〒606-8322 京都府 京都市左京区 岡崎入江町 24-308 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都 中央区 銀座二丁目 6 番 12 号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, [続葉有]

(54) Title: AMINOKETONE ASYMMETRIC REDUCTASE AND NUCLEIC ACID THEREOF

(54) 発明の名称: アミノケトン不斉還元酵素及びその核酸

(57) Abstract: A protein which is an aminoketone asymmetric reductase acting on 1-2-methylaminopropiophenone to form d-pseudoephedrine and having the following physicochemical properties; and a nucleic acid encoding this protein: substrate: 1-2-methylaminopropiophenone; optimum pH value: 8.1; optimum temperature: 55 °C; coenzyme: NADP; and molecular weight: homotrimer of about 28500 Da.

(57) 要約:

1-2-メチルアミノプロピオフェノンに作用して、d-ブソイドエフェドリンを生成する作用を有し、且つ、以下の理化学的性質を有するアミノケトン不斉還元酵素であるタンパク質及び前記タンパク質をコードする核酸。

基質: 1-2-メチルアミノプロピオフェノン

至適 pH: pH 8.1

至適温度: 55 °C

補酵素: NADP

分子量: 約 28500 Da ホモテトラマー

WO 02/070714 A1

FP04-0397
-00-WO-FY
04.12.28
SEARCH REPORT

明細書

アミノケトン不斉還元酵素及びその核酸

技術分野

本発明は、アミノケトン不斉還元酵素、前記酵素をコードする核酸、
5 前記酵素を産生する微生物及びこれらを用いた光学活性アミノアルコールの製造方法に関する。

背景技術

エフェドリンは古くから発汗、解熱、鎮咳などの目的に用いられてきたが、中でもd-ブソイドエフェドリンは抗炎症作用を有することが知られている。また、l-エフェドリンには血管収縮作用、血圧上昇作用
10 または発汗などの薬理作用が知られており、交感神経興奮剤として医療に使用される。また、l-エフェドリンは気管支喘息治療にも使用される。すなわち、光学活性なエフェドリンを含む光学活性 β -アミノアルコールを製造する方法は、医薬またはその中間体を製造する過程において有用であり、効率的な製造方法が望まれている。
15

従来、所望の光学活性を有する β -アミノアルコールの製造方法としては、ラセミ体の β -アミノアルコールを得た後、光学分割あるいは不斉合成等によって特定の光学活性体を製造する方法が用いられていた。

しかし、ラセミ体の β -アミノアルコールその分子内に2個の不斉炭素を有するため、特定の光学活性体を得るためには煩雑な工程を経なければならなかった。
20

例えば、Ger.(East)13683, Aug, 27, 1957 によれば、 β -アミノアルコールの一種である光学活性エフェドリンの場合、ベンズアルデヒドから酵母を利用した発酵によって得られた光学活性フェニルアセチルカルビ
25 ノールにメチルアミンを還元縮合することにより、エリスロー1-2-メチルアミノ-1-フェニル-1-プロパノール、すなわち、l-エフ

又は前記タンパク質の用途を提供することを目的とする。さらに、 α -アミノケトン化合物又はその塩のエナンチオマー混合物から効率よく光学活性 β -アミノアルコールを変換する新規微生物を提供することを目的とする。

- 5 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、特定の微生物から精製されたアミノケトン不斉還元酵素を用いることにより、 α -アミノケトン化合物またはその塩のエナンチオマー混合物の一方の鏡像異性体のみを還元し、対応する β -アミノアルコールの4種の異性体のうち1種のみを選択的かつ高収率で製造することができることを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明のタンパク質は、1-2-メチルアミノプロピオフェノンに作用して、d-ブソイドエフェドリンを生成する作用を有し、且つ、以下の理化学的性質を有するアミノケトン不斉還元酵素であることを特徴とするタンパク質である。

- 15 基質：1-2-メチルアミノプロピオフェノン
至適pH：pH 8.1
至適温度：55℃
補酵素：NADP
分子量：約28500Daホモテトラマー

- 20 また、本発明のタンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質である。

- さらに、本発明のタンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、且つ、アミノケトン不斉還元活性を有
- 25 することを特徴とするタンパク質あるいはそれらの部分ペプチドである。

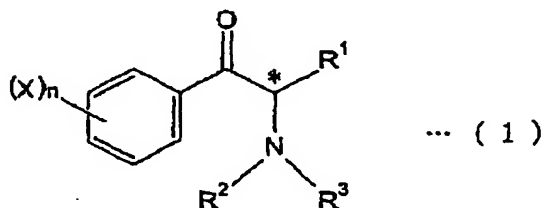
ここで、前記タンパク質の塩、あるいは前記タンパク質の部分ペプチ

ガノデルマ(*Ganoderma*)属、ハイボクレア(*Hypocrea*)属、ヘリコスチルム(*Helicostylum*)属、バーチシリウム(*Verticillium*)属、フサリウム(*Fusarium*)属、トリチラチウム(*Tritirachium*)属、モルチエレラ(*Mortierella*)属、アルミラリエラ(*Armillariella*)属、シリンドロカルボン(*Cylindrocarpon*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、アウレオバクテリウム(*Aureobacterium*)属、キサントモナス(*Xanthomonas*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)属、スボロボロマイセス(*Sporobolomyces*)属、スポリディオボルス(*Sporidiobolus*)属、ロドコッカス(*Rhodococcus*)属に属する微生物群から選ばれる少なくとも一つの微生物であり、且つ、1-2-メチルアミノプロピオフェノン還元しd-ブソイドエフェドリンを生成する能力を有する微生物を培養する培養工程と、前記培養工程で得られた微生物からアミノケトン不斉還元酵素またはその部分ペプチドを精製する工程とを含むことを特徴とする方法である。

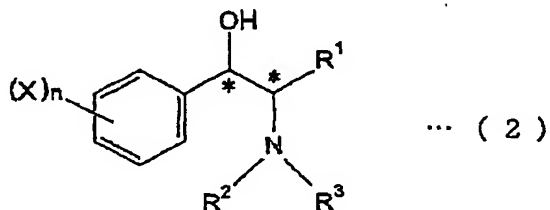
また、本発明の微生物は、ロドコッカス属 *Rhodococcus* に属し、且つ、1-2-メチルアミノプロピオフェノン還元しd-ブソイドエフェドリンを生成する能力を有することを特徴とする微生物である。

中でも、前記微生物がロドコッカス エリスロポリス *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 株 (FERM BP-7451号) であることが好ましい。

また、本発明の光学活性アミノアルコールの製造方法は、一般式(1)：



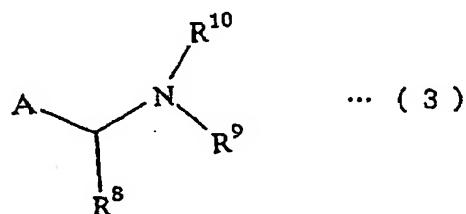
で表される α -アミノケトン化合物またはその塩のエナンチオマー混合物に、前記形質転換体、ロドコッカス属に属する微生物及びロドコッカス (エリスロポリス) *Rhodococcus (erythropolis)* MAK-34 からなる群より選ばれるいずれか一つの微生物を作用させて一般式 (2) :



5

で表される光学活性アミノアルコール化合物であって、所望の光学活性を有する該化合物を生成せしめることを特徴とする光学活性アミノアルコールの製造方法である。

前記光学活性アミノアルコールの製造方法においては、一般式 (3) :



10

(上記式中 A は、構造式 (Y) または (Z) を表し、



(R^4 は、水素原子、置換基を有していてもよい炭素数 1 ~ 3 のアルキ

い。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のアミノケトン不斉還元酵素の SDS-PAGE による電気泳動写真である。

5 図 2 は、本発明のアミノケトン不斉還元酵素の pH 依存性を示したグラフである。

図 3 は、本発明のアミノケトン不斉還元酵素の温度依存性を示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

10 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

なお、本明細書及び図面において、塩基及びアミノ酸等を略号で表示する場合は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature によるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。また、アミノ酸に光学異性体が存在する場合は、特に断らないかぎり L-体を示す。

15 先ず、本発明のタンパク質について説明する。

本発明のタンパク質は、1-2-メチルアミノプロピオフェノンに作用して、d-ブソイドエフェドリンを生成する作用を有し、且つ、以下の理化学的性質を有するアミノケトン不斉還元酵素であることを特徴とするタンパク質である。

基質：1-2-メチルアミノプロピオフェノン

至適 pH：pH 8.1

至適温度：55℃

補酵素：NADP

25 分子量：約 28500 Da ホモテトラマー。

前記タンパク質は、1-2-メチルアミノプロピオフェノンに作用し

てもよい。

微生物の培養は、生育に適した条件下で行うことができる。具体的には培地のpH 3～10、好ましくは4～9、温度0～50℃、好ましくは20～40℃で行うことができる。微生物の培養は、好氣的または嫌氣的条件下で行うことができる。培養時間は10～150時間が好ましいが、それぞれの微生物により適宜決められるべきである。

このようにして培養された微生物は、その培養液をろ過または遠心分離して菌体を得、その菌体を水又は緩衝液でよく洗浄する。洗浄した菌体は適量の緩衝液に懸濁し、菌体を破碎する。破碎の方法としては特に制限はないが、例えば、乳鉢、ダイノミル、フレンチプレス、超音波破碎機等の機械的破碎法が挙げられる。得られた菌体の破碎液中より、固形物をろ過または遠心分離によって除去して得られた無細胞抽出液中のアミノケトン不斉還元酵素は酵素単離の常法によって採取される。

このような酵素単離の方法としては特に制限はなく、公知の方法を用いることができるが、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法等の塩析；セファデックス等によるゲルろ過法；ジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基等を持つ担体等を用いたイオン交換クロマトグラフィー法；ブチル基、オクチル基、フェニル基等疎水性基を持つ担体等を用いた疎水性クロマトグラフィー法；色素ゲルクロマトグラフィー法；電気泳動法；透析；限外ろ過法；アフィニティ・クロマトグラフィー法；高速液体クロマトグラフィー法等により精製することができる。

さらに、前記酵素を固定化酵素として用いることもできる。このような方法としては特に制限はなく、公知の方法を用いることができるが、酵素又は酵素産生細胞を固定化したものが挙げられ、共有結合法や吸着法といった担体結合法、架橋法、包括法等により固定化できる。また、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレ

(*Microbacterium arborescens*)、スヒンゴバクテリウム マルチボラム
(*Sphingobacterium multivorum*)、ノカルディオイデス シンプレックス
(*Nocardioides simplex*)、ムコー アンビグアス(*Mucor ambiguus*)、
ムコー ジャバニカス(*Mucor javanicus*)、ムコー フラジリス(*Mucor*
5 *fragilis*)、アブシジア リヒテイミ(*Absidia lichtheimi*)、アスベルジラ
ス アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスベルジラス ニガー
(*Aspergillus niger*)、アスベルジラス オリーゼ(*Aspergillus oryzae*)、
アスベルジラス キャンディダス(*Aspergillus candidus*)、アスベルジラ
ス オリーゼ バー. オリーゼ (*Aspergillus oryzae* var. *oryzae*)、アス
10 ベルジラス フォエチダス バー. アシダス(*Aspergillus foetidus* var.
acidus)、ペニシリウム オキサリカム(*Penicillium oxalicum*)、グリフ
オーラ フロンドーサ(*Grifola frondosa*)、ユーロチウム レベンス
(*Eurotium repens*)、ガノデルマ ルシダム(*Ganoderma lucidum*)、ハ
イボクレア ゼラチノーザ(*Hypocrea gelatinosa*)、ヘリコスチルム ニ
15 グリカンズ(*Helicostylum nigricans*)、バーチシリウム ファンジコーラ
バー. ファンジコーラ(*Verticillium fungicola* var. *fungicola*)、フサリウ
ム ロゼウム(*Fusarium roseum*)、トリチラチウム オリーゼ
(*Tritirachium oryzae*)、モルチエレラ イサベリナ(*Mortierella*
isabellina)、アルミラリエラ メレア(*Armillariella mellea*)、シリンド
20 ロカルボン スクレロチゲナム(*Cylindrocarpon sclerotigenum*)、クレ
ブシエラ ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)、アウレオバクテリウ
ム エステラロマチカム(*Aureobacterium esteraromaticum*)、キサント
モナス(*Xanthomonas* sp.)、シュードモナス ブチダ(*Pseudomonas*
putida)、マイコバクテリウム スメグマチス(*Mycobacterium*
25 *smegmatis*)、マイコバクテリウム ジエンホフェリ(*Mycobacterium*
diernhoferi)、マイコバクテリウム バカエ(*Mycobacterium vaccae*)、

運動性：－

孢子：－。

(2) 培養的性質

培養温度：30℃

- 5 コロニー形態：円形、周辺侵食状、凸状、やや光沢あり、クリーム色
ゼラチンの液化：－。

(3) 生理学的性質

グラム染色：＋

硝酸塩還元：－

- 10 クエン酸塩の利用：＋

ウレアーゼ：＋

オキシダーゼ：－

カタラーゼ：＋

酸素に対する態度：好気性

- 15 O/Fテスト：－

ピラジミダーゼ：－

ピロリドニルアリルアミダーゼ：－

アルカリフォスフォターゼ：＋

β -グルクロニダーゼ ：－

- 20 β -ガラクトシダーゼ ：－

α -グルコシダーゼ：＋

N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ：－

エスクリン（グルコシダーゼ）：＋

炭水化物の利用性

- 25 乳糖：－

麦芽糖：＋

L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., "Gene", Vol. 34, p. 315 (1985);
5 T. Grundstroem et al., "Nucleic Acids Res", Vol. 13, p. 3305 (1985); J. Taylor et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, p. 8765 (1985); R. Wu ed., "Methods in Enzymology". Vol. 155. p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., "Gene", Vol. 44, p. 177 (1986) に記載の方法が挙げられる。具体的には、例えば、合成オリゴヌクレオチド等を利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)、
10 Kunkel 法、dNTP [α S] 法 (Eckstein) 法、亜硫酸や亜硝酸等を用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

また、多くのタンパク質には糖鎖が付加されている場合があり、アミノ酸を 1 若しくは複数置換することにより糖鎖の付加を調節することができる。従って、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、
15 前記糖鎖の調節されたタンパク質も上述のアミノケトン不斉還元活性を有する限りは、本発明のタンパク質に包含される。

さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えば、ペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ等の酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体に改変することができる。

また、遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のアミノケトン不斉還元酵素と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。この場合、
25 遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうし

生ずる変異体の一つであることもできる。こうした本発明のアミノケトン不斉還元酵素は、下記で説明するように分離・精製処理されることができる。一方では、こうして本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有するアミノケトン不斉還元酵素のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。該アミノケトン不斉還元酵素の塩基配列は、修飾（例えば、付加、除去、置換等）されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。

次に、本発明の核酸について説明する。

本発明の核酸は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることを特徴とする核酸である。

すなわち、一つのアミノ酸をコードする塩基配列（コドン）は複数存在するため、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸は多数存在する。従って、このような核酸も本発明の核酸に包含される。ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNAが2本鎖である場合には、相補2本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有するものを含むことを意味するため、本発明の核酸には配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を直接コードする塩基配列からなる核酸若しくはその相補的な塩基配列からなる核酸も包含される。

また、本発明の核酸は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有することを特徴とする核酸である。

配列表の配列番号2に記載の塩基配列は、上述した微生物からゲノムDNAを抽出し、アミノケトン不斉還元酵素のアミノ酸配列に基づいて設計した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR (Polymerase chain reaction) 法により得られたDN

PCR 反応は、当該分野で公知の方法、あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350(1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487(1988); Henry A. Erlich, PCR Technology, Stockton Press 等に
5 記載された方法に従って行うことができる。反応は、例えば、市販のキットや試薬を利用して行うことが出来る。

得られた増幅 DNA 断片をシーケンスし、精製酵素のアミノ酸配列と相同な配列を含むことを確認し、それをアイソトープで標識しプローブとしてその後の実験等に使用する。塩基配列の決定は、ダイデオキシ法、例えば M 1 3 ダイデオキシ法等、Maxam-Gilbert 法等を用いて行う
10 ことができるが、市販のシーケンシングキット、例えば Taq ダイブライマーサイクルシーケンシングキット等を用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光 DNA シーケンサー装置等を用いて行うことが出来る。プローブ等を放射性同位体等によって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムド DNA ラベリングキット(Boehringer
15 Mannheim)等を使用して行うことが出来る。

また、本発明のアミノケトン不斉還元酵素遺伝子は、例えば次の方法でクローニングできる。具体的には、遺伝子組換え技術は、例えば T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. T. (1989); 日本生化学会編、「続
20 生化学実験講座 1、遺伝子研究法 I I」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 I I I (組換え DNA 技術)」、東京化学同人(1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68, Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods
25 in Enzymology", Vol. 100 & 101, Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153, 154 &

ターである。

ここで、前記核酸を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、等の真核細胞宿主）中で前記核酸にコードされているタンパク質が発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適なコドンを導入することや、制限酵素部位を設けることも可能である。また、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列等、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプター等、さらには抗生物質耐性等を制御したり、代謝を制御したりし、菌体の選別等に有用な配列等を含ませることが可能である。

前記プラスミドに含まれるプロモーターとしては、大腸菌を宿主とするプラスミドでは、例えば、トリプトファン（*trp*）プロモーター、ラクトース（*lac*）プロモーター、トリプトファン・ラクトース（*tac*）プロモーター、リボプロテイン（*lpp*）プロモーター、 λ ファージP_Lプロモーターが挙げられ、酵母を宿主とするプラスミドでは、例えば、GAL1、GAL10プロモーターが挙げられる。

また、大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えば、pBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pVC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KSTM(Stratagene)が挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223(Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30等も挙げられる。

酵母を宿主とするプラスミドとしては、例えば、YIp型ベクター、

ドヌクレアーゼが挙げられ、具体的には、例えば、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼI、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼIII、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼVII、λエキソヌクレアーゼ、DNase I、ヌクレアーゼS1、マイクロコッカス (Micrococcus) ヌクレアーゼが挙げられる。

DNAリガーゼとしては、例えば、大腸菌DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼが挙げられる。

DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、例えば、プラスミド、λファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACが挙げられる。中でも、λファージ由来のベクターが好ましく、具体的には、例えば、Charon4A、Charon21A、λgt10、λgt11、λDASHII、λFIXII、λEMBL3、λZAPII™ (Stratagene) が挙げられる。

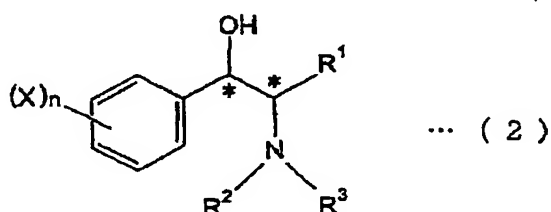
本発明のベクターを前述したような宿主細胞に導入することにより、本発明のアミノケトン不斉還元酵素を産生可能な微生物又は動物細胞等の形質転換体を得られる。このような形質転換体も本発明に包含される。

前記形質転換の方法としては特に制限はなく、公知の方法を用いて行うことができるが、例えば、適当な細胞壁溶解酵素を用いて調製したプロトプラスト化した細胞に、塩化カルシウム、ポリエチレングリコール等の存在下でDNAを接触させる方法や、リン酸カルシウム法、リポフエクシオン法、エレクトロポレーション法(例えば、E. Neumann et al., "EMBO J", Vo. 1, pp.841 (1982))、マイクロインジェクション法、遺伝子銃により打ち込む方法が挙げられる。

また、前記形質転換体を用いることにより、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として製造することが可能である。このような組換えタンパク質の製造方法も本発明に包含される。

れる少なくとも一種を示し、*は不斉炭素を示す)

で表される α -アミノケトン化合物またはその塩のエナンチオマー混合物に前記のタンパク質を作用させて一般式(2):



5 (式中、X、n、R¹、R²、R³及び*は前記と同じ)

で表される光学活性アミノアルコール化合物であつて、所望の光学活性を有する該化合物を生成せしめることを特徴とする光学活性アミノアルコールの製造方法である。

10 先ず、本発明にかかる一般式（１）で表される α -アミノケトンについて説明する。

前記一般式(1)で示される α -アミノケトン化合物またはその塩のエナンチオマー混合物であり、式中、Xは同一または異なってもよく、ハロゲン原子、低級アルキル基、保護基で保護されていてもよいヒドロキシル基、ニトロ基およびスルホニル基からなる群より選ばれる少なくとも一種を示し、nは0~3の整数を示し、R¹は低級アルキル基を示し、R², R³は同一または異なってもよく、水素原子および低級アルキル基からなる群より選ばれる少なくとも一種を示し、*は不斉炭素を示す構造を有するものである。

以下、前記 α -アミノケトンに含まれる置換基Xについて説明する。

前記ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子およびヨウ素原子などが挙げられる。

5 イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基およびヘキシル基などが挙げられる。これらは直鎖状または分枝状のいずれの構造を取っていてもよい。また、置換基として、フッ素原子や塩素原子などのハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基、アミノ基およびアルコキシ基などを有していてもよい。

また、前記Xはニトロ基またはスルホニル基でもよく、具体的にはメチルスルホニル基などが挙げられる。

さらに、前記Xの数nは0～3の整数であり、好ましくは0である。

10 また、前記一般式(I)中のR¹は低級アルキル基を示す。このような低級アルキル基としては炭素数1～6のアルキル基が好ましく、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基およびヘキシル基などが挙げられる。これらは直鎖状または分枝状のいずれの構造を取ってもよい。

15 R²、R³は水素原子または低級アルキル基を示す。前記低級アルキル基には炭素数1～6のアルキル基が含まれ、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基およびヘキシル基などが挙げられる。これらは直鎖状または分枝状のいずれの構造を取ってもよい。

20 また、前記 α -アミノケトン化合物の塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩などの無機酸の塩、または、酢酸、クエン酸などの有機酸の塩が挙げられる。

25 前記 α -アミノケトンは、対応する1-フェニルケトン誘導体の α 炭素をハロゲン化、例えば、ブロム化後、ブロム基などのハロゲンをアミンに置換することによって容易に合成できる(Ger. (East) 11,332, Mar. 12, 1956)。

基質：1-2-メチルアミノプロピオフェノン

至適pH：pH 8.1

至適温度：55℃

補酵素：NADP

5 分子量：約28500Daのホモテトラマー

また、前記タンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、前記タンパク質のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質である。

10 また、本発明の光学活性アミノアルコールの製造方法においては、前記タンパク質に代えて、前記形質転換体、ロドコッカス属に属する微生物、ロドコッカス(エリスロポリス)Rhodococcus(erythropolis)MAK-34株(FERM BP-7451号)を直接反応系の中に添加して光学活性アミノアルコールの製造を行ってもよい。

15 次に、本発明にかかる一般式(2)で表される光学活性アミノアルコールについて説明する。

前記一般式(2)におけるX、n、R¹、R²、R³及び*は前記一般式(1)と同様である。さらに所望の光学活性を有するβ-アミノアルコールとしては(1S, 2S)アミノアルコールが挙げられる。

20 前記反応を行う際の反応条件としては、例えば、液体培地で振盪培養した形質転換菌を集菌し、得られた菌体にアミノケトン水溶液(0.1～10%濃度)を加え、pHを6～8に調整しながら温度10～40℃で数時間から1日反応させればよい。反応終了後、菌体を分離し、反応液中の生成物を単離することにより、光学活性アミノアルコールを得ることができる。ここで、形質転換菌の処理菌体(乾燥菌体や固定化菌体等)や形質転換菌から得られた酵素、又は、固定化酵素等も同様にして

25

5 のアルキル基、 R^8 と結合してなる炭素数5～10の炭化水素環、 R^5 または R^9 と結合してなる1～3個のヘテロ原子を含む5～8員環のヘテロ環状骨格を表し、 R^7 は、水素原子、置換基を有していてもよい炭素数1～6のアルキル基を表し、 R^8 は水素原子、カルボキシ基、置換基を有していてもよい炭素数1～6のアルキル基、 R^4 と結合してなる1～3個のヘテロ原子を含む5～8員環のヘテロ環状骨格、 R^6 と結合してなる炭素数5～10の炭化水素環を表し、 R^9 は水素原子、置換基を有していてもよい炭素数1～6のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数1～6のアルキルオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアシル基、 R^5 または R^6 と結合してなる1～3個のヘテロ原子を含む5～8員環のヘテロ環状骨格を表し、 R^{10} は水素原子または置換されていてもよい炭素数1～6のアルキル基を表す。)

10 で表される化合物、又はその製薬学的に許容される塩あるいは溶媒和物を反応系にさらに加えて反応を行うことにより、より効率的に光学活性
15 アミノアルコールの製造を行うことが可能である。

前記一般式(3)において、炭素数1～3のアルキル基としては、直鎖状、分枝状のいずれであってもよく、具体的にはメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基などが挙げられる。また、炭素数1～6のアルキル基としては、直鎖状、分枝状のいずれであってもよく、具体的にはメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、 i -ブチル基、 s -ブチル基、 t -ブチル基、ペンチル基およびヘキシル基などが挙げられる。炭素数5～10の炭化水素環としてはシクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニルおよびシクロデカニルなどが挙げられる。

20 ヘテロ原子1～3個を含む5～8員環のヘテロ環状骨格において、ヘテロ原子としては窒素原子、酸素原子、硫黄原子などが挙げられ、特に

ン、1-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-2-ヒドロキシプロパン、
1- α -ブチロキシカルボニルアミノ-2-ヒドロキシプロパン、2-
アミノ-3-ヒドロキシブタン、DL-セリン、1-アミノ-2-ヒド
ロキシプロパン、1-アミノ-2-ヒドロキシブタン、1-アミノ-2
5 -ヒドロキシシクロヘキサンが挙げられる。これらのうち、不斉炭素原
子を有する化合物においては、特に記載がない限り、光学活性体であっ
ても、ラセミ体であってもよい。

これら活性誘導剤を培地中に添加することにより、微生物の活性が誘
導され、その後の光学活性な β -アミノアルコールの生成は、無添加時
10 に比べ効率よく進行する。活性誘導剤は各々単独で用いてもよく、また
は複数の誘導剤の混合物で用いてもよい。このような活性誘導剤の添加
量は、培地に対し0.01~10重量%が望ましい。

以上説明したように、天然のアミノケトン不斉還元酵素、例えば、ロ
ドコッカスエリスロポリス由来の天然のアミノケトン不斉還元酵素また
15 はそれと実質的に同等な活性を有するタンパク質をコードする遺伝子構
造が明らかにされ、前記タンパク質をコードする塩基配列を含有するD
NAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いるタンパク質の製
造方法、さらにはそれらタンパク質及び宿主細胞を用いての光学活性ア
ミノアルコールの製造等の用途において飛躍的な発展を期待でき、さら
20 にアミノケトン不斉還元酵素そのものの改変により酵素活性の飛躍的な
上昇を可能ならしめることが可能である。

実施例

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は
以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(アミノケトン不斉還元酵素の精製)

ル 10%、塩化ニッケル 1mM、ニコチン酸 1mM、塩化ナトリウム 0.15M
を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) で溶離した。溶出した酵素活
性画分 1.45ml をグリセロール 10%、塩化ニッケル 1mM、ニコチン酸
1mM を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) に対して透析を行った
5 結果、精製酵素 293 μ g を含む精製酵素液を得た。

このようにして精製されたアミノケトン不斉還元酵素の性質を以下に
示す。

(1) 基質特異性及び酵素活性：

1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 10 μ l、16mMNADP+25 μ l、精製酵
10 素液 215 μ l を 43°C に保ち、1-アミノ-2-ヒドロキシプロパン 1 μ l
を加えてアミノアセトンを生成させた。反応に伴う NADPH の増減を
340nm の波長の吸光度変化で測定した。酵素活性の測定は下記条件で 1
分間に 1 μ mol の 1-アミノ-2-ヒドロキシプロパンが酸化される酵
素活性を 1 単位 (U) とする。その結果、全活性は 126mU、比活性は
15 432mU/mg、活性収率は 0.22% であった。

同様にして、1-2-メチルアミノプロピオフェノン、1-2-ジメ
チルアミノプロピオフェノン、1-アミノ-2-ブタノンに作用するこ
とが確認された。

(2) 分子量

20 ゲルろ過法を用いて測定した場合は約 105,000、SDS ポリアクリルア
ミドゲル電気泳動法を用いて測定した場合は約 28,500 であった(図 1)。
このことから本酵素は分子量約 28,500 のサブユニット 4 個からなる四
量体タンパクであると考えられた。

(3) 至適 pH

25 精製酵素液 10 μ L、水 420 μ L、1M トリス塩酸緩衝液 20 μ L、16mM
NADP+水溶液 50 μ L を混合し、45°C にてインキュベートし、1-アミノ-2-

③AAQMGFIRTA AIELAPK (配列番号 5)

④XXILAVQAMMPXL (配列番号 6)

⑤XITINAVLP GNVITEGLDGLGQEYLDQM (配列番号 7)。

前記ペプチドの分取条件を以下に示す。

5 システム : SMART system

カラム : μ RPC C2/C18 SC2.1/10

流速 : 100 μ l/min

溶離液 : A, 0.1% TFA

B, 0.1% TFA/80% CH₃CN

10 溶出条件 : 0-15min (100%A) \rightarrow 15-75min (100%A \rightarrow 100%B) のグラ
ジエント溶出

カラム温度 : 室温

検出波長 : 214nm および 280nm。

(2) ゲノム DNA の作製

15 対数増殖期後期の菌体 (MAK-34) を遠心分離機で集菌した。得られ
た菌体を TES buffer (5mM Tris, 1mM EDTA, 2.5% シュクロース,
pH 8.0) に懸濁した。この懸濁液に EDTA、H₂O、Lysozyme と Proteinase
K を添加し 37°C で 2.5 時間ゆっくり攪拌した。これに、SDS 添加後、攪
拌した溶菌サンプルをフェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルム
20 で順次処理して除タンパク操作をおこなった。ここに、3M 酢酸ナ
トリウム 1/10 容、エタノール 2.5 倍容添加し、DNA をガラス棒に巻き
付けた。これを、70%、80%、90% のエタノールで順次洗浄し、風乾し
た DNA を TE buffer (10mM Tris、1mM EDTA、pH 7.8) に溶解し、
RNase A 処理したサンプルをフェノール、フェノール/クロロホルム、ク
25 ロロホルムで順次処理して除タンパク操作をおこなった。ここに、3M
酢酸ナトリウム 1/10 容、エタノール 2.5 倍容添加し DNA を沈殿させた

センスプライマー (49 μ M)	3 μ l
アンチセンスプライマー (41 μ M)	3 μ l
dNTP (各 2.5mM)	4 μ l
ExTaq ポリメラーゼ (TAKARA)	0.3 μ l
ExTaq ポリメラーゼ緩衝液	5 μ l
H ₂ O	29.7 μ l
合計	50 μ l

また、温度条件は以下の通りである。

94°C/4 分

94°C/1 分、50°C/1 分、72°C/1.5 分 : 35 サイクル

72°C/10 分。

得られた増幅 DNA 断片の塩基配列を決定した後アミノ酸配列に変換したところ、アミノケトン不斉還元酵素の内部ペプチドの部分アミノ酸配列と同じ箇所が見出された。

塩基配列を決定した際に塩基配列が不明であった領域の塩基配列の決定をするために、inverse PCR を行った。inverse PCR は、例えば H. Ochman, et al., Genetics, Vol. 120, pp. 621(1988)などに記載された方法にしたがって行われた。

まず、ゲノム DNA 溶液を制限酵素 (BglII) 処理し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿によって得られた、DNA 断片を T4DNA リガーゼ (TAKARA) で処理してセルフライゲーションした。これを、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿することによって得られた環状化 DNA を鋳型として、塩基配列が既知の部分から設計したセンスプライマー (IPCR-S1) 及びアンチセンスプライマー (IPCR-A1) を使用して、下記の条件で PCR をおこなった。PCR 増幅により、約 2kb の増幅 DNA 断片を得た。

GATGAATTCCAAATGTTCAACTCCATTGA (配列番号 12)

EcoRI Start

EsA

TGAAGCTTTCGTCGCTTGTCTTACAGTTC (配列番号 13)

5 HindIII Stop

これらのプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型として下記の条件で PCR を行った。その結果、約 0.8kb の増幅 DNA 断片が得られた。PCR の条件を以下に示す。

	ゲノム DNA (36ng/ μ l)	5 μ l (180ng)
10	センスプライマー (100 μ M)	0.5 μ l
	アンチセンスプライマー (100 μ M)	0.5 μ l
	dNTP (各 2.5mM)	8 μ l
	LA-Taq ポリメラーゼ (TAKARA)	0.5 μ l
	LA-Taq ポリメラーゼ緩衝液	5 μ l
15	Mg ²⁺	5 μ l
	H ₂ O	25.5 μ l
	合計	50 μ l

以下に PCR 時の温度条件を示す。

94°C/4 分

20 94°C/1 分、60°C/1 分、72°C/1.5 分 : 25 サイクル

72°C/10 分

こうして得られた PCR 産物は両端にそれぞれ EcoRI と HindIII の制限酵素サイトを持つので、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した後、制限酵素 (EcoR I、HindIII) 処理した。これをアガロース電気泳動後、バンドの切り出しを行い、GFX PCR DNA, Gel Band Purification Kit で精製した。これを、制限酵素 (EcoR I、HindIII) 処

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6) にて平成13年2月15日に受託されている。

実施例 3

(d-(1S, 2S) プソイドエフェドリンの生成)

5 グルコース1%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%を含む培地5mlに表1に記載の各微生物を植菌し、30℃、48時間振盪培養を行った。培養液を遠心分離して菌体を得た後、試験管に入れ、これに0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)1mlを加え懸濁した。これにd,l-2-メチルアミノ-プロピオフェノン塩酸塩1mgを加え、
10 30℃で24時間振盪し反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除き、上清をHPLCに付して、光学活性なプソイドエフェドリンを得た(μBondapakphenyl ウォータース社製、径4mm、長さ300mm、溶離液0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(7%アセトニトリル含有)、pH5.0、流速0.8ml/分、検出光波長UV220
15 nm)。

絶対配置及び光学純度はHPLC(住化分析センター製カラムスミキラルAGP、径4mm、長さ150mm、0.03Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、流速0.5ml/分、検出光波長220nm)で測定した。その結果、表1及び表2に示すように、d-プソイドエフェ
20 ドリンのみが選択的に得られた。

生成したd-プソイドエフェドリンの光学純度および生成量は表1及び表2のとおりである。以下、生成量は、全て塩酸塩に換算した量を示す。

表 2

微生物		生成量 (mg/ mL)	光 学 純 度 (%) d-アソイ ドエフェド リン
属	IFO		
<i>Nocardioides simplex</i>	12069	0.35	99.0
<i>Mycobacterium phlei</i>	13160	0.27	95.6
<i>Mucor ambiguus</i>	6742	0.07	93.0
<i>Mucor javanicus</i>	4570	0.04	95.0
<i>Mucor fragilis</i>	6449	0.17	90.0
<i>Absidia lichtheimi</i>	4009	0.04	93.0
<i>Aspergillus awamori</i>	4033	0.18	93.0
<i>Aspergillus niger</i>	4416	0.11	90.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	4177	0.18	91.0
<i>Aspergillus candidus</i>	5468	0.07	94.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	IAM 2630	0.08	92.0
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i>	6215	0.05	95.0
<i>Penicillium oxalicum</i>	5748	0.06	94.0
<i>Grifola frondosa</i>	30522	0.08	92.0
<i>Eurotium repens</i>	4884	0.08	92.0
<i>Ganoderma lucidum</i>	8346	0.05	92.2
<i>Hypocrea gelatinosa</i>	9165	0.27	92.2
<i>Helicostylum nigricans</i>	8091	0.27	93.2
<i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>acidus</i>	4121	0.43	91.9
<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	6624	0.10	92.7
<i>Fusarium roseum</i>	7189	0.40	89.6
<i>Tritirachium oryzae</i>	7544	0.34	92.0
<i>Armillariella mellea</i>	31616	0.28	91.0
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	1038	0.14	95.0
<i>Sporobolomyces</i> <i>coralliformis</i>	1082	0.2	95.0

実施例 4

5 グルコース 1%、ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.3%を含む培地に
 モルガネラ モルガニイ (*Morganella morganii*) IFO 3848 を植菌し、
 30℃で48時間、好氣的に振盪培養した。この培養液 5 ml を遠心分
 離して菌体を得た後に風乾し、得られた乾燥菌体を 0.05 M トリス塩酸

表 3

培地 1 の組成	培地 2 の組成	培地 3 の組成	培地 4 の組成
サッカロース 1% コーンスチーブリカー 0.5% リン酸 1カリウム 0.1% リン酸 2カリウム 0.3% p-アミノ安息香酸 0.01% pH7.0	グルコース 0.1% トリアプトン 0.5% 酵母エキス 0.5% リン酸 2カリウム 0.1% pH7.0	グルコース 1% バクトベプトン 0.5% 酵母エキス 0.3% pH7.0	可溶性でんぷん 1% グルコース 0.5% N2アミンタイプ A 0.3% トリアプトン 0.5% 酵母エキス 0.2% リン酸 2カリウム 0.1% 硫酸マグネシウム 7水和物 0.05%

実施例 7

(誘導剤添加による影響 (3))

5 実施例 5 の 1-アミノ-2-ヒドロキシプロパンを 1-アミノ-2-ヒドロキシブタンに代えた以外は実施例 5 と同様にして培養、反応を行った。菌体の分離は、遠心分離または培養液からのろ過によって行った。その結果、表 5 に示すように、化合物を添加し培養した場合のプロソイドエフェドリン生成量は無添加の培養に比較し著しい増大を示した。

て行った。その結果、表 6 に示すように、化合物を添加し培養した場合のブソイドエフェドリン生成量は無添加の培養に比較し著しい増大を示した。

にロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) MAK-34
を植菌し、30℃、48時間振盪培養を行った。培養液を遠心分離して
菌体を得た後、試験管に入れ、これに0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液
(pH 7.0) 1.0 mlを加え懸濁した。これにd l-2-メチルア
5 ミノプロピオフェノン塩酸塩 10 mg、グルコース 20 mgを加え、3
0℃で16時間振盪し反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離し
て菌体を除き、上清をHPLCに付して、光学活性なブソイドエフェド
リンを得た (μ Bondaspherephenyl Waters社製、径4 mm、長
さ150 mm、溶離液0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液 (7%アセト
10 ニトリル含有、pH 6.5)、流速0.8 ml/分、検出波長220 nm)。
その生成量は表7に示したように誘導剤無添加の場合に比較し著しく高
い値を示した。

性を有するタンパク質、前記タンパク質をコードする核酸、前記核酸で形質転換せしめた形質転換体、前記形質転換体を用いる前記タンパク質の製造方法及び前記形質転換体又は前記タンパク質の用途を提供することが可能となる。さらに、 α -アミノケトン化合物又はその塩のエナントオマー混合物から効率よく光学活性 β -アミノアルコールを変換する新規微生物を提供することが可能となる。

5

1 1 . 請求項 1 0 に記載の形質転換体において発現させて得られるタンパク質またはその部分ペプチド。

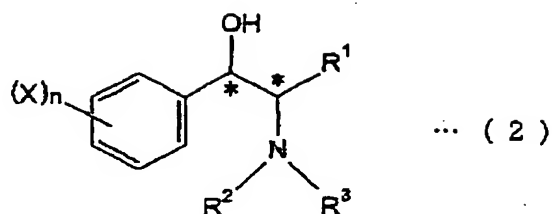
1 2 . 請求項 1 0 に記載の形質転換体を該形質転換体が増殖可能な培地中で培養する培養工程と、

5 前記培養工程で得られた該形質転換体からアミノケトン不斉還元酵素またはその部分ペプチドを精製する精製工程と、

を含むアミノケトン不斉還元酵素またはその部分ペプチドの製造方法。

1 3 . モルガネラ (Morganella) 属、 ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、 スヒンゴバクテリウム (Sphingobacterium) 属、 ノ
10 カルディオイデス (Nocardioides) 属、 ムコー (Mucor) 属、 アブシジア (Absidia) 属、 アスペルジラス (Aspergillus) 属、 ペニシリウム (Penicillium) 属、 グリフォーラ (Grifola) 属、 ユーロチウム (Eurotium) 属、 ガノデルマ (Ganoderma) 属、 ハイボクレア (Hypocrea) 属、 ヘリコスチルム (Helicostylum) 属、 バーチシリウム (Verticillium) 属、 フサリウム (Fusarium) 属、 トリチラチウム (Tritirachium) 属、 モルチエレラ (Morti
15 erella) 属、 アルミラリエラ (Armillariella) 属、 シリンドロカルボン (Cylindrocarpon) 属、 クレブシエラ (Klebsiella) 属、 アウレオバクテリウム (Aureobacterium) 属、 キサントモナス (Xanthomonas) 属、 シュードモナス (Pseudomonas) 属、 マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、 スポ
20 ロボロマイセス (Sporobolomyces) 属、 スポリディオボルス (Sporidiobolus) 属、 ロドコッカス (Rhodococcus) 属に属する微生物群から選ばれる少なくとも一つの微生物であり、 且つ、 1-2-メチルアミノプロピオフェノン還元し d-ブソイドエフェドリンを生成する能力を有する微生物を培養する培養工程と、

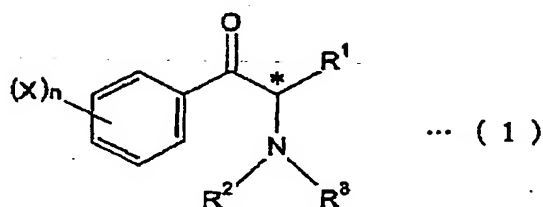
25 前記培養工程で得られた微生物から請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のタンパク質またはその部分ペプチドを精製する精製工程と、



(式中、X、n、R¹、R²、R³及び*は前記と同じ)

で表される光学活性アミノアルコール化合物であって、所望の光学活性を有する該化合物を生成せしめる光学活性アミノアルコールの製造方法。

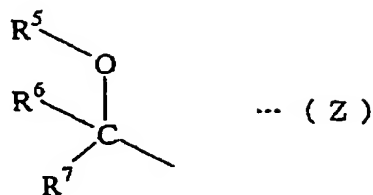
5 17. 一般式(1):



(式中、Xは同一または異なってもよく、ハロゲン原子、低級アルキル基、保護基で保護されていてもよいヒドロキシル基、ニトロ基およびスルホニル基からなる群より選ばれる少なくとも一種を示し、nは0～3の整数を示し、R¹は低級アルキル基を示し、R²、R³は同一または異なってもよく、水素原子および低級アルキル基からなる群より選ばれる少なくとも一種を示し、*は不斉炭素を示す)

で表されるα-アミノケトン化合物またはその塩のエナンチオマー混合物に、請求項10に記載の形質転換体、請求項14に記載の微生物及び請求項15に記載の微生物からなる群より選ばれるいずれか一つの微生物を作用させて一般式(2):

てなる 1～3 個のヘテロ原子を含む 5～8 員環のヘテロ環状骨格を表す。)、



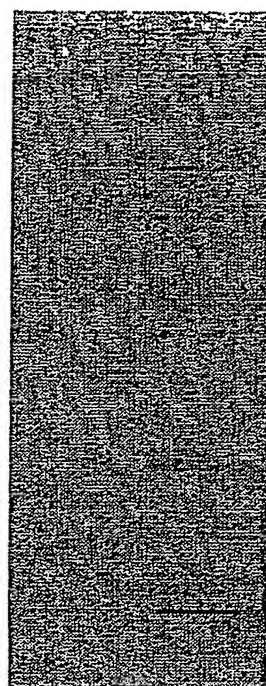
(R⁵ は、水素原子、炭素数 1～3 のアルキル基、若しくは R⁶ 又は R⁹ と結合してなる 1～3 個のヘテロ原子を含む 5～8 員環のヘテロ環状骨格を表し、R⁶ は、水素原子、置換基を有していてもよい炭素数 1～3 のアルキル基、R⁸ と結合してなる炭素数 5～10 の炭化水素環、R⁵ または R⁹ と結合してなる 1～3 個のヘテロ原子を含む 5～8 員環のヘテロ環状骨格を表し、R⁷ は、水素原子、置換基を有していてもよい炭素数 1～6 のアルキル基を表す。)、

R⁸ は水素原子、カルボキシル基、置換基を有していてもよい炭素数 1～6 のアルキル基、R⁴ と結合してなる 1～3 個のヘテロ原子を含む 5～8 員環のヘテロ環状骨格、R⁶ と結合してなる炭素数 5～10 の炭化水素環を表し、R⁹ は水素原子、置換基を有していてもよい炭素数 1～6 のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数 1～6 のアルキルオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアシル基、R⁵ または R⁶ と結合してなる 1～3 個のヘテロ原子を含む 5～8 員環のヘテロ環状骨格を表し、R¹⁰ は水素原子または置換されていてもよい炭素数 1～6 のアルキル基を表す。)

で表される化合物、又はその製薬学的に許容される塩あるいは溶媒和物をさらに添加して光学活性アミノアルコールを生成させる光学活性アミ

図 1

サブユニット エムアール
28.5kda



97.4kDa

66.3

42.2

30.0

20.1

SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi fine chemical Co., LTD.

5 <120> Amino-ketone asymmetric reduction enzyme and their nucleic acid

<130> FP02-0052-00

<140>

10 <141>

<150>JP2001-58698

<151>March 2, 2001

15 <160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 259

<212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 1

25 Met Phe Asn Ser Ile Glu Gly Arg Ser Val Val Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Leu Gly Met Val Arg Val Phe Ala Arg Ala Gly Ala

20 25 30

30

Asn Val Leu Met Thr Ala Arg Asp Ala Leu Thr Leu Glu Arg Ala Ala

35 40 45

Glu Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Ala Val Ser Thr Leu Gln Val Asp

35 50 55 60

Gly Glu Leu

5 <210> 2
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus erythropolis

10 <400> 2
 atgttcaact ccattgaagg tcgttcggtc gtcgtcaccg gcggtagcaa gggcatcggc 60
 ttgggaatgg tccgggtatt cgcgcgcgca ggggccaatg tgctcatgac cgcgcgagac 120
 gctctgactc tcgaacgtgc cgcggagggt ttgaatggtc ttcttggcgc ggtctccaca 180
 cttcaagtgc acgtcacgaa tcctgactcc ttggccggta tggcagaagt tgcggccgag 240
 cgacacggag gaatcgacgt gttgtgcgcg aacgctggga tcttcccgtc gaagcgggtg 300
 ggagagatga cctcggagga catggacagc gtattcggcg tcaacgtcaa ggggaccatc 360
 cacgcctgac aagcgtgcat gccgtggctc gaaacttctg gcgctggaag ggttgtcgtg 420
 acatcgtcga tcaccggacc cgtaaccggt tatccgggtt ggtcgcacta cggggcaagc 480
 aaggctgcgc agatgggctt catccgaact gctgccattg agttggcacc gaagaggatc 540
 acgatcaacg ccgtcttgcc cggcaacgtg atcacgagg ggctcgacgg tttgggacag 600
 gaatatctcg accaaatggc gtccagcgtc ccggccggca gtctgggcag cgtcgaggat 660
 atgccaatg ccgcactgtt ctttgactg gacgaagccg cgtacatcac cgtcagtcg 720
 ttgatcgtag atggtggaca ggttcttccg gactcggcga tggcgctcgg cgaactgtaa 780

25 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus erythropolis

30 <400> 3
 Met Phe Asn Ser Ile Glu Gly Arg Ser Val Val Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

35 Lys

<210> 7

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 7

10 Xaa Ile Thr Ile Asn Ala Val Leu Pro Gly Asn Val Ile Thr Glu Gly
1 5 10 15

Leu Asp Gly Leu Gly Gln Glu Tyr Leu Asp Gln Met
20 25

15

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
polynucleotide
degenerate primer

25

<400> 8

atgttyaayw snathgargg nmg

23

<210> 9

30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

35

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
polynucleotide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
polynucleotide

5

<400> 12

gatgaattcc aaatgttcaa ctccattga

29

10

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
polynucleotide

20

<400> 13

tgaagctttc gtcgcttgtc ttacagttc

29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01928

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BESSE P. et al., Enantioselective synthesis of both enantiomers of cathinone via the microbiological reduction of 2-Azido-1-Phenyl-1-propanone. J.Org. Chem. 1994, Vol.59, No.26, pages 8288 to 8291	1-18
A	HILL J.A. et al., Enantiospecific synthesis of [1- ³ H]-(+)-pseudoephedrine hydrochloride. J.Labelled.Comp.d.Radiopharm. 1990, Vol.28, No.6, pages 681 to 689	1-18

BEST AVAILABLE COPY

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 60-172953 A (相模中央化学研究所) 1985.09.06 (ファミリーなし)	1-18
A	BESSE P. et al., Enantioselective synthesis of both enantiomers of cathinone <i>via</i> the microbiological reduction of 2-Azido-1-Phenyl-1-propanone. J.Org.Chem. 1994, Vol.59. No.26, pages 8288-8291	1-18
A	HILL J.A. et al., Enantiospecific synthesis of [1- ³ H]-(+)-pseudoephedrine hydrochloride. J.Labelled.Compd.Radiopharm. 1990, Vol.28, No.6, pages 681-689	1-18